

12

ISSN 0100-9443

Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

do Ministério da Agricultura

Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte - CNPGC

METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DE ESTIRPES DE Rhizobium EM NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

Campo Grande, MS
1983



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA ISSN 0100-9443
Vinculada ao Ministério da Agricultura
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte-CNPGC

METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DE ESTIRPES DE *Rhizobium*
EM NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

Cesar Heraclides Behling Miranda

Campo Grande, MS
1983

EMBRAPA - CNPGC. Documentos, 12

Pedidos de exemplares desta publicação devem ser dirigidos à

Área de Difusão de Tecnologia

EMBRAPA - CNPGC

Rodovia BR 262 km 4

Caixa Postal 154

79100 - Campo Grande, MS

COMITÊ DE PUBLICAÇÕES

João Camilo Milagres - Presidente

Fernando Paim Costa - Secretário Executivo

Antonio do Nascimento Rosa

Arthur da Silva Mariante

Jairo Mendes Vieira

José Marques da Silva

Jurandir Pereira de Oliveira

Maria Regina Jorge Soares

Raul Henrique Kessler

EDITORÇÃO

Coordenação: Arthur da Silva Mariante

Datilografia: Eurípedes Valério Bittencourt

Desenho: Paulo Roberto Duarte Paes

BEHLING-MIRANDA, C. H. Metodologia de avaliação de estirpes de *Rhizobium* em nódulos de leguminosas. Campo Grande, MS, EMBRAPA-CNPGC, 1983. 24p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 12).

1. *Rhizobium*-Estirpes. 2. Plantas leguminosas-Nódulos. I. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Campo Grande, MS. II. Título. III. Série.

CDD. 589.95

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO/ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO	7
2 MARCAÇÃO DE ESTIRPES PELA OBTENÇÃO DE MUTANTES A ANTIBIÓTICOS	8
2.1 Obtenção de Mutantes	9
2.2 Avaliação de Mutantes introduzidos em nódulos ..	10
3 MARCAÇÃO POR SOROLOGIA	11
3.1 Obtenção de anticorpos	11
3.1.1 Preparação do antígeno	11
3.1.2 Inoculação em coelhos	12
3.1.3 Coleta de sangue e avaliação do título ...	13
3.1.4 Conservação do soro	16
4 AVALIAÇÃO DE ESTIRPES MARCADAS SOROLOGICAMENTE POR IMUNOAGLUTINAÇÃO	17
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DE ESTIRPES DE *Rhizobium* EM NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

Cesar Heraclides Behling-Miranda

RESUMO - São apresentadas metodologias de marcação de estirpes de *Rhizobium* e de reconhecimento da estirpe, marcada em sua dinâmica de ocorrência em nódulos de leguminosas, quando usadas como inoculantes em ambiente com estirpes nativas pré-estabelecidas. São descritas rotinas práticas das técnicas de uso de mutantes a antibióticos e de reações de imunoaglutinação.

METHODOLOGY FOR EVALUATION OF *Rhizobium* STRAINS IN LEGUME ROOT-NODULE

ABSTRACT - Procedures to mark *Rhizobium* strains are presented. Methodologies to release the marked strains and to study their behaviour under field conditions in presence of other native *Rhizobium* strains are given. Practical methods for the use of antibiotic mutants and immune-agglutination reaction technics are described.

Engº Agrº, Bolsista da EMBRAPA-CNPCC

METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DE ESTIRPES DE *Rhizobium* EM NÓDULOS DE LEGUMINOSAS

1 INTRODUÇÃO

A prática de inoculação com estirpes pré-selecionadas de *Rhizobium*, reconhecidamente capazes de alta eficiência em fixação de N_2 atmosférico e transferência de Nitrogênio em forma assimilável ao hospedeiro, é critério básico para o incremento da proteína e da matéria seca em leguminosas produtoras de grãos e forrageiras. O processo tem mostrado, na prática, ser uma fonte segura de aumento de produtividade e economia de insumos nitrogenados (Dobereiner & Duque 1980).

Paralelamente à alta capacidade de fixação, uma estirpe deve também ser capaz de formar nódulos prontamente, ser competitiva com *Rhizobia* nativos do solo e microorganismos residentes antagônicos e persistir no solo após sua introdução (Brockwell & Dudman 1968; Chatel et al. 1968; Freire et al. 1983).

Weaver & Frederik (1974a), por exemplo, demonstraram, em trabalho com soja, que áreas contendo população estabelecida de *Rhizobia* superior a mil células por grama de solo não respondem significativamente à inoculação, e que, para se obterem 50% dos nódulos formados com uma estirpe inoculada, seria necessário introduzir 1.000 vezes mais células do que as existentes no solo (Weaver & Frederik 1974b).

Diversas técnicas e metodologias têm sido propostas e usadas para se marcar com segurança uma estirpe de *Rhi-*

zobium e acompanhar sua dinâmica no ambiente, quando inoculada. Entre estas, citam-se o uso de estirpes indutoras de clorose (Means et al. 1961), uso de mutantes a altas concentrações de antibióticos (Obaton 1971; Schwinghamer & Dudman 1973), resistência intrínseca a vários antibióticos (Josey et al. 1979), resistência a gradientes de concentração de antibióticos (Bromfield et al. 1982), marcações genéticas (Johnston & Beringer 1975), morfologia de colônias (Pinto et al. 1974) e sorologia (Vincent 1941, 1942, 1970; Dardawal & Sen 1973).

Neste trabalho, faz-se uma compilação das rotinas usadas para marcação individual de estirpes de *Rhizobium* pelo uso de mutantes a antibióticos e por sorologia, com ênfase à técnica de imunoaglutinação.

2 MARCAÇÃO DE ESTIRPES PELA OBTENÇÃO DE MUTANTES A ANTIBIÓTICOS

Dentro de população de uma estirpe definida, buscam-se mutantes a determinado nível de um dado antibiótico.

Os mutantes, quando usados como inoculantes, têm sua dinâmica, no solo ou em nódulos, acompanhada por meio de verificação de ocorrência em isolamentos, feitos sempre em meio de cultura com o antibiótico ao nível em que foram selecionados.

É recomendável, na prática, o uso de marcação pela obtenção de mutantes a mais de um antibiótico, para se evitarem distorções, devidas a ocorrência de mutantes naturais no solo (Bromfield & Jones 1979), possível de ocorrer com frequência, por exemplo, em solos de cerrado, onde foi demonstrado haver predominância de actinomicetos na microflora, notadamente *Streptomyces* (Coelho & Drozdowicz 1979) são produtores naturais de antibióticos, e em solos submetidos à calagem, onde há estímulo ao aumento destes microorganismos (Baldani et al. 1982).

Normalmente usa-se estreptomicina, a qual, da mesma forma que tetraciclina, espiromicina e clorafenicol, rara-

mente interfere na capacidade de fixação da estirpe, como foi demonstrado em relação a novobiocina, penicilina, vancomicina e bacitracina (Brockwell et al. 1977; Bromfield & Jones 1979; Pankhurst 1977; Schwinghamer 1964, 1967; Zelazna-Kowalska & Lorkiewicz 1971).

2.1 Obtenção de mutantes

Preparam-se soluções com o antibiótico escolhido em concentrações crescentes (em ppm por exemplo), e faz-se sua adição por filtração em "milipore" a meio - YMA¹, quando este, após sair da autoclave, estiver com temperatura entre 45 e 50°C.

O meio antibiótico resultante é distribuído em placas de Petri e, depois de solidificado, faz-se em sua superfície a semeadura e dispersão de quantidades de células (por exemplo: 1 ml de solução salina com a estirpe pré-crescida), como na rotina de contagem por diluição.

Noutro procedimento, faz-se a semeadura diretamente na placa, acrescentando-se, a seguir, o meio ainda líquido (45-50°C), fazendo-se movimentos suaves com a placa nas quatro direções básicas e deixando-se solidificar normalmente.

Devem ser feitas repetições para cada tratamento usado e um tratamento testemunha, sem antibiótico, para comparações de crescimento.

As placas semeadas são colocadas, para desenvolvimento bacteriano, em incubadora a 30-32°C e, após o tempo de crescimento característico da estirpe, faz-se avaliação da ocorrência de mutantes, pela formação de colônias características.

Os mutantes selecionados serão os obtidos a uma concentração alta, tomada como padrão e que é muito variável em função, principalmente, do ambiente de origem e

¹ Extrato de levedura, manitol e agar (Vincent 1970).

tornam-se os novos representantes da estirpe.

Poderão, a seguir, ser armazenados normalmente em meio de cultura YMA, sem antibiótico, como na rotina clássica.

2.2 Avaliação de mutantes introduzidos em nódulos

Feita a inoculação com os mutantes, para a avaliação de sua ocorrência nos nódulos formados, são tomados, na coleta, número de nódulos representativo do total formado por planta, fazendo-se repetições de plantas, tantas quantas forem necessárias, em um tratamento. Destes nódulos, é feito isolamento direto de *Rhizobia*, em meio de cultura com o nível do antibiótico ao qual o mutante foi obtido, fazendo-se também isolamento em meio sem antibiótico para comparações de ocorrências efetivas de *Rhizobia* em todos os nódulos. Em uma placa de Petri podem ser isoladas bactérias de até 10 nódulos.

Os nódulos dos quais foram isolados *Rhizobia* capazes de crescerem no meio com o antibiótico foram formados pela estirpe mutante, podendo-se expressar a ocorrência desta em porcentagem do total formado, sendo, os nódulos restantes, formados por estirpe susceptível ao antibiótico, nativa do solo, ou inoculada junto com o mutante.

Os resultados dos isolamentos podem ser dispostos como no seguinte esquema resumido:

Meio YMA normal				Meio YMA + antibiótico			
Planta	Nódulo			Planta	Nódulo		
	1	2	3		1	2	3
a	X	X	X	a	X	X	X
b	X	X	X	b	X		
c	X	X	X	c		X	X

A interpretação seria:

- Meio YMA normal: ocorrência positiva de *Rhizobia* em todos os nódulos.

- Meio YMA + antibiótico: ocorrência positiva do mutante nos nódulos 1, 2, 3, na planta a, no nódulo 1 na planta B e nos nódulos 2 e 3, planta c.

Obtidos anticorpos específicos, pode-se fazer o reconhecimento da estirpe indutora por diferentes técnicas, como: imunoaglutinação (Dudman & Brockwell 1968; Means et al. 1964; Parker & Grove 1970), imunoprecipitação por difusão em gel (Dudman 1964, 1971; Skerdleta 1969), eletroforese (Roberts et al. 1980), imunofluorescência (Trinick 1969; Jones & Russel 1972) e marcação enzimática (Elisa Test) (Krishinevsky & Bar-Joseph 1978).

Rotineiramente, em trabalhos de avaliação de estirpes marcadas em nódulos, faz-se uso de técnicas de imunoaglutinação, que apresentam metodologia de fácil manuseio.

3 MARCAÇÃO POR SOROLOGIA

A formação de anticorpos específicos a determinantes antigênicos distintos de uma estirpe de *Rhizobium* em animais como o coelho, por exemplo, é um meio seguro para marcação e posterior diferenciação entre estirpes antigenicamente diferentes (Date & Decker 1965, Graham 1963).

3.1 Obtenção de anticorpos

3.1.1 Preparação do antígeno

Rhizobium possui indutores antigênicos, somáticos e flagelares (Vincent 1941, 1942; Vincent et al. 1973), sendo estes últimos comuns a grupos de bactérias, podendo ocorrer reações cruzadas quando de seu uso. São termolábeis e, na prática, eliminados por exposição do calor. Os somáticos estão incluídos na célula e são estáveis ao calor.

Fazendo-se crescer a estirpe a ser marcada em meio YMA sólido, inclinado em tubo de ensaio, suspende-se a colônia resultante em solução fisiológica (NaCl 0,9% 3 a 5 ml) em

frasco estéril, fazendo-se, caso necessário, a limpeza de pedaços de agar incluídos por centrifugação a baixa rotação.

A solução resultante, com turbidez avaliada conter número superior a 10 células/ml, é mantida por 30 minutos em banho-maria a 100°C para eliminação dos indutores flagelares. A seguir, faz-se divisão desta solução em duas partes, mantendo-se uma como padrão, para posterior checagem dos anticorpos formados ou outras comparações, e a outra parte será usada como inóculo no animal escolhido, mantendo-se ambas, quando não em uso, em refrigerador a 4°C.

3.1.2 Inoculação em coelhos

Devido a facilidade de obtenção, manuseio e qualidade do soro produzido, normalmente usam-se coelhos como produtores de anticorpos para *Rhizobium*.

É preciso escolher animais jovens, maduros sexualmente, com peso superior a 3 kg e, se possível, da mesma raça.

A inoculação de solução antígena pode ser feita intravenosamente na veia marginal da orelha e intramuscularmente, com ou sem uso de adjuvante, escolhendo-se uma região de pouca irrigação sanguínea, como na região plantar, entre os dedos ou costal, no pré-escapular.

Dudman (1973) sumariza esquemas de inoculação descritos por diversos autores, sendo mais usado na prática a de Schmidt et al. (1968), com as seguintes características:

- aplicação, durante três dias seguidos, de 0,5; 1,0 e 1,5 ml da solução antigênica na veia marginal da orelha;
- descanso por três dias seguidos;
- novas aplicações, por três dias, de 1,5; 2,0 e 2,0 ml da solução antigênica;
- descanso durante sete dias;
- coleta de sangue (até 5 ml) e quantificação dos anticorpos formados (avaliação do título do soro).

Caso se obtenha bom título, faz-se coleta de maior volume de sangue, por punção cardíaca ou sacrifício do animal.

A inoculação na veia marginal da orelha, na prática, é feita após desinfecção local com álcool, estando o coelho seguro por um auxiliar e mantido preso enrolado em uma faixa de tecido ou toalha.

O mesmo auxiliar pressiona a veia com os dedos, fazendo com que esta inche, devido ao corte do fluxo normal do sangue, o que pode ser favorecido, dando-se batidas com os dedos na orelha do animal.

Com este procedimento, facilita-se a localização e introdução da agulha na veia.

Com a mão direita o operador introduz a agulha, com a esquerda firma a seringa e a orelha, fazendo então a descarga do volume da seringa suavemente.

Usam-se seringas descartáveis, com agulhas finas, tipo de seringas de um ml ou agulhas próprias "scalp leps - cath", encontradas em revendedores especializados.

3.1.3 Coleta de sangue e avaliação do título

Escolhido e posto em prática o esquema de inoculação do antígeno, no tempo previsto fazem-se retiradas de sangue para obtenção do antisoro, no qual se fará uma avaliação preliminar semiquantitativa de seu potencial em anticorpos que reagem com o antígeno específico.

A retirada do sangue pode ser feita por punção cardíaca, coletando-se o sangue diretamente do coração ou através de um corte leve na veia marginal da orelha.

A primeira técnica é indolor, possibilita a retirada de maior volume de sangue, e o animal tem recuperação imediata, enquanto a segunda é mais traumatizante e possibilita a coleta de pouca quantidade de sangue.

A punção cardíaca é feita mediante a introdução de agulha esterilizada pela parte central superior da caixa torácica, com leve angulação para a esquerda, ou lateralmente, evitando-se as costelas, tendo-se verificado antes, por tato, a provável localização do coração.

A retirada deve ser suave, mas segura, para evitar que ocorra coagulação do sangue, o que entupirá a agulha.

O coelho deve estar seguro firmemente por um auxiliar, mantido pela região pré-escapular e no pós-íleo.

O sangue é recolhido em tubo de ensaio, deixado à temperatura ambiente por 2 a 3 h e, por igual período de tempo, em refrigerador; torna-se novamente ao ambiente por menor período de tempo e, a seguir, faz-se a separação do uso e do coágulo por centrifugação a 2.000 rpm durante 10 minutos.

O título é obtido mediante o contraste entre soluções diluídas do soro e concentrações constantes do antígeno, e a última diluição em que ocorrer aglutinação total, visualizada pela formação de grumos, é o título do soro, e equivale à quantidades de unidades aglutinantes (anticorpos) por unidade de volume de soro.

As diluições do soro são feitas em solução fisiológica com pH em torno do neutro, fazendo-se sempre o uso de duas repetições por diluição, para verificação da ocorrência da aglutinação total (positivo nas duas repetições) ou parcial (positivo em uma repetição).

Na prática com *Rhizobium*, fazem-se diluições seriadas de 1:25 (1 ml de soro em 24 ml de solução fisiológica ou frações correspondentes) até 1:3200 numa 1ª bateria de tubos, por diluição contínua da metade do volume do tubo anterior, em igual volume de solução fisiológica no tubo seguinte, oito vezes seguidas.

Numa 2ª bateria, onde podem ser usados tubos menores, tipo dos usados para hemólise ou placas de microtitulação, transfere-se 0,2 ml de cada diluição individual do soro e 0,2 ml de solução antigênica, mantida como padrão, obtendo-se, desta forma, diluição à metade, resultando em diluições finais de 1:50 até 1:6400.

O preparo das diluições é esquematizado na Fig. 1.

Fazem-se sempre duas repetições de cada diluição, e, ainda, uma testemunha somente com solução fisiológica e antígeno.

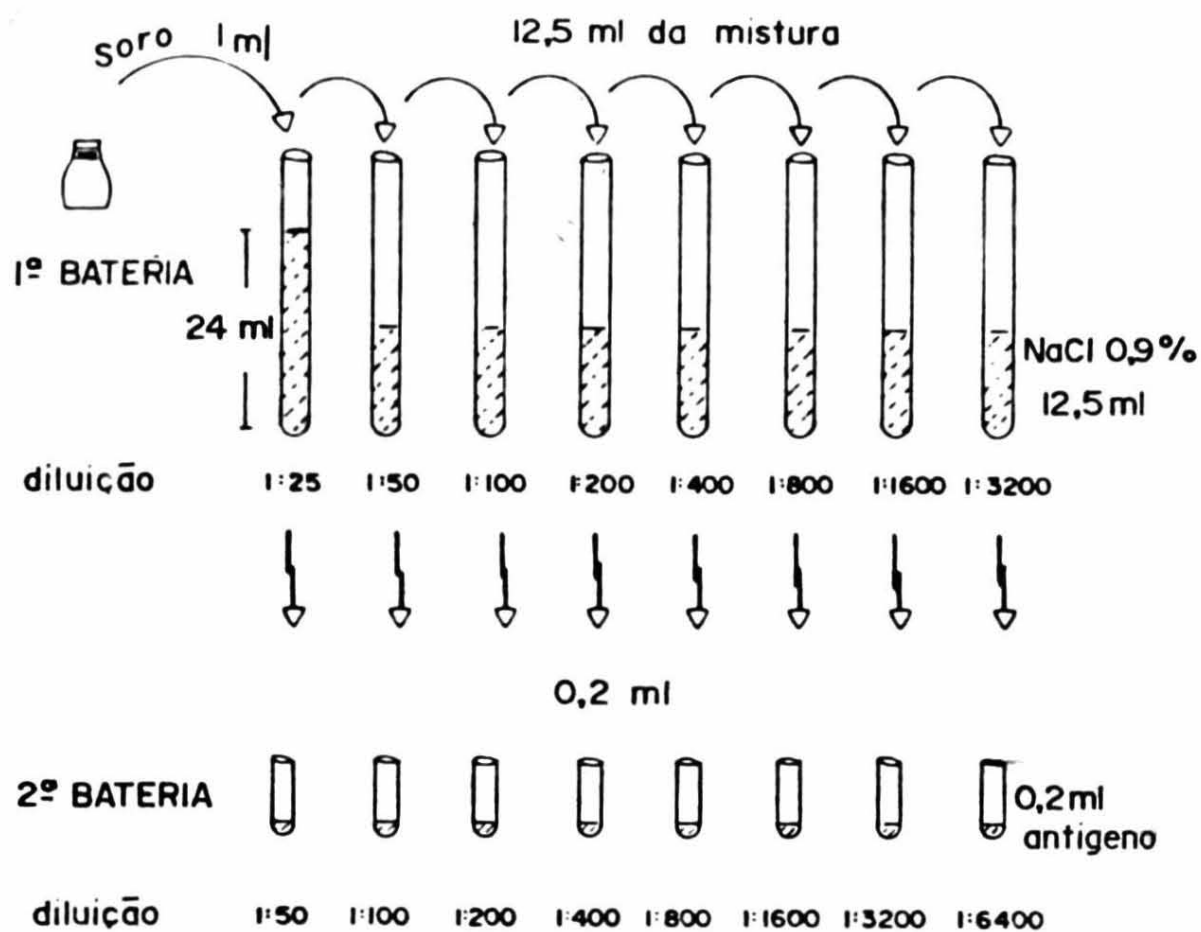


FIG. 1. Preparo de diluições para avaliação de título do soro

Os tubos serão cobertos por papel celofane ou material plástico duro; no caso do uso de placas de microtitulação, coloca-se uma outra placa invertida por cima, mantendo-as em banho-maria por 2 a 3 hs a 56°C.

Em alguns casos se obtêm melhores resultados mantendo-se em banho-maria 3 a 4 hs a 37°C.

A leitura é feita frente a um fundo escuro iluminado, podendo, para maior segurança, ser feita com o auxílio de uma lupa e, na última diluição em que se notar a formação de grumos facilmente distinguíveis, tem-se o título do soro, sendo considerados bons títulos para reações de aglutinações, os iguais ou superiores a 1:1600.

Caso o título obtido esteja abaixo deste patamar, é recomendável que se faça nova inoculação da solução antigênica (2,0 ml), com nova avaliação do título sete dias após.

Quando se obtém bom título e caso, futuramente se torne a usar coelho para novas produções de soro, pode-se fazer retiradas parciais de até 30 ml de sangue de cada vez, tendo-se o cuidado de repor, na circulação, solução fisiológica, para não se interferir em excesso no sistema de irrigação sangüínea do animal.

3.1.4 Conservação do soro

A conservação do soro pode ser feita pela adição de solução 1% de mertiolate até concentração de 1:10000 (0,1 ml em 10 ml de soro), pela adição de solução 10% de fenol até concentração de 0,5% (0,5 ml em 9,5 ml de soro) ou glicerina, em partes iguais, com soro (1:1).

Caso se use glicerina, deve-se considerar, futuramente, que se fez diluição à metade do soro original.

Adicionado o conservante escolhido, faz-se estocagem em "freezer" a -16°C ou em refrigerador a 4°C, sendo recomendável dividir o estoque original em partes proporcionais ao uso de rotina, evitando-se contaminações ou desnaturalização de componentes por sucessivos descongelamentos.

4 AVALIAÇÃO DE ESTIRPES MARCADAS SOROLOGICAMENTE POR IMUNOAGLUTINAÇÃO

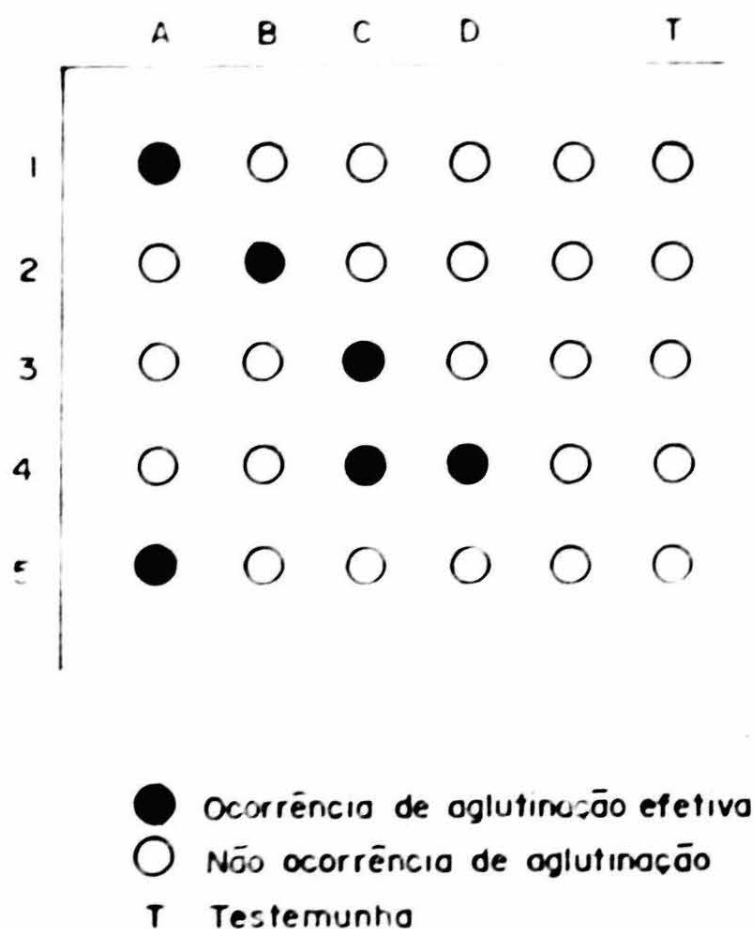
Obtido o anticorpo específico, pode-se avaliar a ocorrência da estirpe marcada em isolados de nódulos, em nódulos secos, após sua reidratação com água.

Means et al. (1964) propõem metodologia de avaliação por aglutinação em nódulo grandes, do tipo de soja e feijão, e Parker & Grove (1970) propõem metodologia similar para avaliações em nódulos pequenos, do tipo de trevo e alfafa.

Basicamente, o procedimento de avaliação obedece ao seguinte esquema: (Means et al. 1964):

- nódulos frescos ou secos reidratados são dispostos individualmente em tubos pequenos, adicionando-se 3 a 4 ml de solução fisiológica;
- faz-se esmagamento dos nódulos com bastão de vidro ou pinça, lavando-se bem o material usado a cada mudança de tubo;
- dilui-se com solução fisiológica a suspensão resultante, até haver turbidez equivalente em todos os tubos;
- leva-se a bateria de tubos a banho-maria a 100°C, por 30 minutos;
- Após esfriar, transfere-se 0,2 ml de soro de cada estirpe e 0,2 ml de extrato de cada nódulo (antígeno) a ser testado para tubos pequenos ou placa de microtitulação, fazendo com que o extrato de cada nódulo contraste com todos os soros (Fig. 2). Fazer testemunha: extrato e solução fisiológica;
- leva-se a banho-maria por 3 a 4 hs a 56°C;
- faz-se leitura, observando onde ocorreu aglutinação (formação de grumos).

A diluição do soro a ser usada é aquela pré-determinada na checagem de título que possibilitou melhor formação e visualização dos grumos.



Avaliação

- nodulo 1 e 5 - presença da estirpe A
- nodulo 2 - presença da estirpe B
- nodulo 3 - presença da estirpe C
- nodulo 4 - infecção mista por C e D ou possível ocorrência de reação cruzada

FIG. 2. Disposição em placa de microtitulação de extrato de nódulos (1,2,3,4...) e soros marcados (A,B,C,D...) para determinação da ocorrência de estirpes em nódulos.

O período de incubação em banho-maria pode ser feito, ainda, a 37°C, por 2-3 horas, e a leitura após uma noite, mantendo-se, neste período, a bateria em refrigerador a 4°C. Este parâmetro deve ser padronizado experimentalmente para as condições apresentadas em trabalhos distintos.

A percentagem dos nódulos com reação positiva no teste, sendo estas amostras representativas do total de nódulos formados e de plantas por tratamento, dá a percentagem de ocorrência da estirpe marcada.

Quando ocorrer confusão entre estirpes sabidamente distintas, por ocorrência de reações cruzadas, devido a similaridade antigênicas em escala variável entre as estirpes, é aconselhável se fazer o uso de reações de imunoprecipitação por difusão em gel, que possibilita identificar o grau de similaridade existente, dando maior precisão à avaliação.

O procedimento é descrito por Vincent (1970).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; XAVIER, P.F.; BODDEY, R. M. & DÖBEREINER, J. Efeito da calagem no número de actinomicetos e na percentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. R.Bras.Microbiol., 13(3):250-63, 1982.
- BROCKWELL, J. & DUDMAN, W.F. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments.II. Initial competition between seed inocula in the nodulation of *Trifolium subterraneum* L. seedling. Aust.J.Agric.Res., 19:749-57, 1968.

- BROCKWELL, J.; SCHWINGHAMER, E.A. & GAULT, R.R. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. V. A critical examination of the stability of antigenic and streptomycin-resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. Soil Biol.Biochem., 9(1):19-24, 1977.
- BROMFIELD, E.S.P. & JONES, D.G. The competitive ability and symbiotic effectiveness of doubly labelled antibiotic resistant mutants of *Rhizobium trifolii*. Ann.Appl.Biol., 91(2):211-9, 1979.
- BROMFIELD, E.S.P.; STEIN, M. & WHITE, R.P. Identification of *Rhizobium* strains on antibiotic concentrations gradients. Ann.Appl.Biol., 101(2):269-77, 1982.
- CHATEL, D.L.; GREENWOOD, R.M. & PARKER, C.A. Saprophytic competence as an important character in the selection of *Rhizobium* for inoculation. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 9., Australia, 1968. Transactions., v.2. p.65-73.
- COELHO, R.R.R. & DROZDOWICZ, A. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. R.Ecol.Biol. Sol, 15:459-73, 1979.
- DARDAWAL, K.R. & SEN, A.N. Serological studies with strains of *Rhizobium* isolated from pulse crops of India. Ind.J. Microbiol., 13:7-12, 1973.
- DATE, R.A. & DECKER, A.M. Minimal antigenic constitutions of 28 strains of *Rhizobium japonicum*. Canad.J.Microbiol., 11:1-8, 1965.
- DÖBEREINER, J. & DUQUE, F.F. Contribuição da pesquisa biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. R.Econ.Rural, 18(3):447-60, 1980.

- DUDMAN, W.F. Antigenic analysis of *Rhizobium japonicum* by immune-diffusion. Appl.Microbiol., 21(6):973-85, 1971.
- DUDMAN, W.F. Recognition of *Rhizobium* strains by gel immune-diffusion. Notes and coments on technique. Rhizobium Newsl., 9(2):148-53, 1964.
- DUDMAN, W.F. Summary of immunization procedure used in preparation of antisera to *Rhizobium* strains. Rhizobium Newsl., 18(1):47-54, 1973.
- DUDMAN, W.R. & BROCKWELL, J. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. I. A survey of field performance of clover inoculants by gel immune-diffusion serology. Aust.J.Agric.Res., 19:739-47, 1968.
- FREIRE, J.R.J.; KOLLING, J.; VIDOR, C.; PEREIRA, J.S.; KOLLING, I.G. & MENDES, N.G. Sobrevivência e competição por sítios de nodulação de estirpes de *Rhizobium japonicum* na cultura da soja. R.Bras.Ci.Solo, 7(1): 47-53, 1983.
- GRAHAM, P.H. Antigenic affinities of the root-nodule bacteria of legumes. Antonie Van Leeuwenhoek, 29: 281-91, 1963.
- JOHNSTON, A.W. & BERINGER, J.E. Identification of *Rhizobium* strains in pea root-nodules using genetic markers. J.Gen.Microbiol., 87:343-50, 1975.
- JONES, D.G. & RUSSEL, P.E. The application of immunefluorescence techniques to host plant nodule bacteria seletivity experiments using *Thipholium repens*. Soil Biol.Biochem., 4:277-82, 1972.

- JOSEY, D.P.; BEYNON, J.L.; JOHNSTON, A.W.B. & BERINGER, J.E. Strains identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. J.Appl.Bacteriol., 46:343-50, 1979.
- KISHINEVSKY, B. & BAR-JOSEPH, M. *Rhizobium* strain identification in *Arachis hypogae* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Canad.J.Microbiol., 24 (1):537-43, 1978.
- MEANS, U.M.; JOHNSON, H.A. & DATE, R.A. Quick serological method of classifying strains of *Rhizobium japonicum* in nodules. J.Bacteriol., 87:547-53, 1964.
- MEANS, U.M.; JOHNSON, H.W. & ERDMAN, L.W. Competition between bacterial strains affecting nodulation in soybeans. Soil Sci.Soc.Amer.Proc., 25:105-8, 1961.
- OBATON, M. Utilisation de mutantes spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobium*. C.R.Acad.Sci., Paris, Ser.D., 272:2630-3, 1971.
- PANKHURST, C.E. Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast- and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating Lotus species. Canad.J.Microbiol., 23(8):1026-33, 1977.
- PARKER, C.A. & GROVE, P.L. The rapid serological identification of *Rhizobia* in small nodules. J.Appl. Bacteriol., 33:248-52, 1970.
- PINTO, C.; YAO, P.Y. & VINCENT, J.M. Nodulating competitiveness among strains of *Rhizobium meliloti* and *R. trifolii*. Aust.J.Agric.Res., 25:317-29, 1974.
- ROBERTS, G.P.; LEPS, W.T.; SILVER, L.E. & BRILL, W.J. Use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. Appl.Environ.Microbiol., 39:414-22, 1980.

- SCHWINGHAMER, E.A. Association between antibiotic resistance and infectiveness in mutant strains of *Rhizobium* spp. Canad.J.Microbiol., 10:221-32, 1964.
- SCHWINGHAMER, E.A. Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. Antonie Van Leeuwenhoek, 33:121-36, 1967.
- SCHWINGHAMER, E.A. & DUDMAN, W.F. Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with *Rhizobium* spp. J.Appl.Bacteriol., 36:263-72, 1973.
- SCHMIDT, E.L.; BANKOLE, R.O. & BOHLOOL, B.B. Fluorescent-antibody approach to study of *Rhizobia* in soil. J.Bacteriol., 45(6):1987-92, 1968.
- ŠKRDLETA, V. Application of immunoprecipitation in gel for the serological-typing of soybean root-nodules. Folia Microbiol., 14:32-5, 1969.
- STEIN, M.; BRMFIELD, E.S.P. & DYE, M. An assessment of a method based on intrinsic antibiotic resistance for identifying *Rhizobium* strains. Ann.Appl.Biol., 101:261-7, 1982.
- TRINICK, M.J. Identification of legume bacteroids by fluorescent antibody reaction. J.Appl.Bacteriol., 32:181-6, 1969.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific, 1970. 164p. (IBP. Handbook, 15).
- VINCENT, J.M. Serological studies of the root-nodule bacteria. I. Strains of *Rhizobium meliloti*. Proc. Linn.Soc. N.S.W., 66:145-54, 1941.

- VINCENT, J.M. Serological studies of the root-nodule bacteria. II. Strains of *Rhizobium trifolii*. Proc. Linn.Soc.N.S.W., 67:82-6, 1942.
- VINCENT, J.M.; HUMPHREY, B.A. & ŠKRDLETA, V. Group antigens in slow-growing *Rhizobia*. Arch.Microbiol., 89:79-82, 1973.
- WEAVER, R.W. & FREDERIK, L.R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* (L.) Merril. I. Field studies. Agron.J., 66:233-6, 1974a.
- WEAVER, R.W. & FREDERIK, L.R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* (L.) Merril. II. Greenhouse studies. Agron.J., 66:229-32, 1974b.
- ZELAZNA-KOWALSKA, I. & LORKIEWICZ, Z. Transformation in *Rhizobium trifolii*. IV. Correlation between streptomycin resistance and infectivess in *Rhizobium trifolii*. Acta Microbiol.Pol., Ser. A., 3:11-20, 1971.

IMPRESSO PELO SISTEMA
SICORA

da

THESAURUS EDITORA

SIG Q. 08 - Lt. 2356

70.610 - BRASÍLIA - DF

FONES: 225-3011 - 225-8805

Tiragem: 1.100 exemplares